

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-509256

(43) 公表日 平成11年(1999) 8月17日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

C 0 8 B 37/08

C 0 8 B 37/08

Z

A 6 1 K 31/725

A 6 1 K 31/725

C 0 8 L 5/08

C 0 8 L 5/08

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願平9-506592  
(86) (22) 出願日 平成8年(1996) 5月28日  
(85) 翻訳文提出日 平成10年(1998) 1月16日  
(86) 国際出願番号 PCT/SE96/00684  
(87) 国際公開番号 WO97/04012  
(87) 国際公開日 平成9年(1997) 2月6日  
(31) 優先権主張番号 08/503, 323  
(32) 優先日 1995年7月17日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 キュー・メド・アクチエボラーク  
スウェーデン国エス-752 28 ウプサラ、  
セミナリー ガタン21  
(72) 発明者 オーイエルブ、ベンクト  
スウェーデン国エス-756 47 ウプサラ、  
ヘーヴェル ヴエイエン6  
(74) 代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多糖ゲル組成物

(57) 【要約】

本発明は、水溶性の架橋可能な多糖の水溶液を形成させ、多糖の架橋のための多官能性架橋剤の存在下に上記多糖の架橋を開始させ、ゲル化が起こる前に架橋反応の終結を立体的に障害して活性化された多糖を取得し、ついで上記活性化多糖が粘弾性ゲルに至るまで架橋を継続するように非立体障害条件を再導入することからなる架橋生体適合性活性化多糖ゲル組成物の製造方法を提供する。本発明はまた、このような方法で得られるゲル組成物、ならびに様々な医薬的用途の組成物を提供する。

## 【特許請求の範囲】

1. 架橋された生体適合性多糖ゲル組成物の製造方法において、  
水溶性の架橋可能な多糖の水溶液を形成させ、  
多糖の架橋のための多官能性架橋剤の存在下に上記多糖の架橋を開始させ、  
ゲル化が起こる前に架橋反応の終結を立体的に障害して、活性化された多糖  
を取得し、ついで  
上記活性化多糖が粘弾性ゲルに至るまで架橋を完結するように非立体障害条件を再導入する  
各工程からなる方法。
2. 多糖はグルコースアミングルカンからなる群より選択される請求項 1 記載の方法。
3. 上記グルコースアミングルカンはヒアルロン酸である請求項 2 記載の方法。
4. 架橋剤は、アルデヒド、エポキシド、ポリアジリジル化合物、グリシジルエーテルおよびジビニルスルホンからなる群より選択される請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。
5. 上記グリシジルエーテルは 1, 4-ブタンジオールジグリシジルエーテルである請求項 4 記載の方法。
6. 架橋反応の立体障害は架橋反応が実施されている水性媒質を希釈して上記媒質中の多糖の濃度の低下を達成することからなる請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。
7. 非立体障害条件の上記再導入は、架橋反応が実施されている水性媒質を蒸発させて上記媒質中の多糖の濃度の上昇を達成することからなる請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。
8. 非立体障害条件を上記再導入は、架橋反応が実施されている水性媒質の透析である請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。
9. 多官能性架橋剤の存在下における初期の架橋反応はアルカリ性 pH 好ましくは pH 9 以上で実施してエーテル架橋反応を促進する請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

10. 多官能性架橋剤の存在下における初期の架橋反応は酸性 pH、好ましくは pH 2 ~ 6 において実施してエステル架橋反応を促進する請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

11. 架橋反応の上記立体障害は上記架橋剤が消費されてしまう前に行う請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

12. 生物活性物質は架橋多糖ゲル組成物中に、その調製時に好ましくは生理的な pH および塩濃度条件において封入される請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

13. 上記活性物質は、活性化多糖を非立体障害条件に付す前に上記活性化多糖中に溶解または分散することによってゲル組成物内に封入する請求項 12 記載の方法。

14. 上記生物活性物質は、ホルモン、サイトカイン、ワクチン、細胞、および組織増殖性物質からなる群より選択される請求項 12 および 13 のいずれかに記載の方法。

15. 上記組織増殖性物質はコラーゲン、デンプン、デキストラノーマー、ポリラクチドおよびそれらのコポリマーならびにポリ-β-ヒドロキシブチレートおよびそれらのコポリマーから選択されるポリマーである請求項 14 記載の方法。

16. 上記ホルモンはエритроポエチンおよびカルシトニンからなる群より選択される請求項 14 記載の方法。

17. 上記生物活性物質は多糖と反応する官能基を含有し、多糖との化学反応によってゲル構造内に封入される請求項 12 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

18. 官能基を含有する上記生物活性物質を予め多糖に対する架橋剤好ましくは多糖の架橋に使用されるのと同じ架橋剤と反応させる請求項 17 記載の方法。

19. 請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の方法によって調製された、すべての架橋生体適合性多糖ゲル組成物。

20. 請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の方法により架橋反応の上記非立体障害条件を再導入することによる、活性化多糖の架橋の継続の前に得られる部分架橋生体適合性活性化多糖ゲル組成物。

21. 架橋可能な多糖をその多官能性の架橋剤により2工程で架橋し、最初の架橋工程はゲル化が起こる前に架橋反応の立体障害により終結させ、第二の架橋工程は上記架橋反応に対して非立体障害条件を再導入することによって開始させ粘弾性ゲルに到達するまで架橋反応を継続することによって得られる架橋生体適合性多糖ゲル組成物。

22. 請求項2～11のいずれかに記載のいずれかの特徴によって定義される請求項21記載の架橋生体適合性多糖ゲル組成物。

23. 生物活性物質が封入されている請求項21および22のいずれかに記載の架橋生体適合性多糖ゲル組成物。

24. 上記生物活性物質は請求項12～18のいずれかに定義される物質である請求項23記載の架橋生体適合性多糖ゲル組成物。

25. 請求項21～24のいずれかに定義される治療用または予防用多糖ゲル組成物。

26. デポ製剤として適合された請求項25記載の組成物。

27. 治療用または予防用組成物として使用するための請求項21～24のいずれかに記載の組成物。

28. 哺乳動物とくにヒトの組織増殖のための治療用または予防用組成物の製造のための請求項21～24のいずれかに記載の組成物の使用。

29. 哺乳動物とくにヒトのとくにホルモン処置のための治療用または予防用デポ組成物の製造のための請求項21～24のいずれかに記載の組成物の使用。

30. 哺乳動物とくにヒトの治療的または予防的処置方法において、このような処置を必要とする哺乳動物に請求項25～26のいずれかに定義される組成物を投与することからなる方法。

## 【 発 明 の 詳 細 な 説 明 】

## 多糖ゲル組成物

発 明 の 分 野

本発明は、生体適合性多糖ゲル組成物の分野に関し、さらに特定すればこの種の組成物を架橋して新しいゲル構造を得る新規な方法に関する。この新しい構造は、従来知られているゲル組成物に改良された性質を付与すると同時に、この組成物それ自体および活性成分を含有する組成物の新規な使用を可能にする。

発 明 の 背 景

生体医学の分野においては水-結合ゲルが広く使用されている。それらは一般に、ポリマーを無限のネットワークに化学的に架橋することにより調製される。生体適合性ポリマーを用いる場合には、一般に、その生体適合性を維持するために低い架橋度を用いなければならない。しかしながら、用いられる活性成分の適正な効果を維持するためにはより濃密なゲルが要求されることが多く、このような場合にはしばしば生体適合性が失われる。

水-結合ゲルもしくはヒドロゲルの他の有用な性質は、ペプチドやさらに大きな生物活性物質をその内部に包み込んで徐放性組成物を形成できることである。しかしながら、一般的に活性成分は、それが上述の組成物中に溶解または包含されたのと同じ割合で放出されるので、活性成分の十分な保持時間の達成には実用上の問題がある。しかも、このようなゲルは活性成分をさらに長期間保持することを試みて濃密化されると通常、水と自由に接触する動物組織内では迅速に膨潤する。

医薬的な用途で最も広範に使用されている生体適合性ポリマーの一つはヒアルロン酸である。これは各生存生物体内において同一の組成で存在す

るので、最低限の反応をもたらし、進歩した医薬的利用を可能にする。その結果として、それには多くの修飾の試みが行われてきた。すなわち、アルデヒド、エポキシド、ポリアジリジル化合物およびジビニルスルホンのような物質により架橋されてきた [Laurentら, Acta Chem. Scand. 18(1964)No.1, p.274; EP 0 161 887B1号; EP 0 265 116A2号; US 4,716,154号]。

WO 87/07898号には、多糖と多官能性エポキシドとの反応、過剰の上記エポキシドの除去、および最終的な乾燥操作による上記多糖のフィルム、粉末化材料または類似の乾燥生成物への架橋が開示されている。しかしながら、ここには、活性化された多糖を希釈し、ついでそれを以後実質的に不変の所望の密度または粘稠度に再濃縮することについては何の示唆もない。

US 5,128,326号には、デポ医薬製剤として使用するための多くの改良ヒアルロン酸が開示されている。開示されたゲル製剤の「チャージング」の方法はすべて、活性成分のゲル中への拡散ついでその同一の拡散定数での放出に基づくものである。これに反し、本発明は活性成分の可溶化に続いて、この活性成分の拡散が全く起こらないかあるいはきわめてわずかしき起こらない点までのゲル組成物の濃密化または濃縮に係るものである。

US 5,399,351号には、ゲルとポリマー溶液の混合物であり、この溶液はゲルのレオロジー的性質を改良するために用いられている混合物が開示されている。しかしながら、この場合も、たとえば第6欄第53～58行から推察できるように、可逆的に圧縮されたゲルを開示するものである。

#### 発明の概要

本発明によれば、新規な構造を有しそれによって新しい優れた性質を示す多糖ゲル組成物が、その架橋のための新しい技術を用いることにより得

られることを全く予期せずに見出したものである。この新しい架橋の技術は、製造された多糖ゲル組成物の構造および性質の多様な制御を可能にし、それがまた、意図された目的に合った最終組成物の調整を可能にするものである。

さらに詳しくは、本発明の一つの目的は、高度な架橋もしくは重合にもかかわらず生体適合性の維持が可能な架橋多糖ゲル組成物の製造方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、実質的な程度に架橋されているにもかかわらず、粘弾性を有する多糖ゲル組成物を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、多かれ少なかれ非可逆的に濃密化または濃縮された、すなわち水と接触した場合に実質的にもしくは限られた程度しか膨潤しない

多糖ゲル組成物を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、徐放性組成物またはデポ組成物として使用するための生物活性物質を包含する多糖ゲル組成物を提供することにある。

本発明の他の目的は、様々な目的での治療用または予防用組成物として使用するための様々な生物活性物質を含有する多糖ゲル組成物を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、治療用または予防用組成物の製造ならびに哺乳動物とくにヒトへの投与のための、上述の組成物の使用を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、本発明の上述の方法において中間体として得られる部分架橋された活性化多糖ゲル組成物を提供することにある。この中間体は、任意の所望の場所において、系中で最終的に架橋させることができる。

本発明のこれらの目的およびさらに他の目的は、以下に示すさらに詳細な説明によって明瞭になるものと確信する。

#### 発明の詳細

本発明の一態様においては、本発明は架橋された生体適合性多糖ゲル組成物の製造方法を提供し、この方法は、

水溶性の架橋可能な多糖の水溶液を形成させ、

多糖の架橋のための多官能性架橋剤の存在下に上記多糖の架橋を開始させ、

ゲル化が起こる前に架橋反応の終結を立体的に障害して、活性化された多糖を取得し、ついで

上記活性化多糖が、粘弾性ゲルまでその架橋を継続するように非立体障害条件を再導入する工程から構成される。

換言すれば、本発明の新規な方法は水溶性の架橋可能な多糖を少なくとも２つの工程もしくは段階において架橋する方法に関し、この場合、架橋反応はゲル化が開始される前に中断され、この中断はその架橋反応を立体的に障害することによって達成される。ついで、架橋反応は第二の工程で、立体障害のない条件を再導入することによって継続される。

すなわち第一に、上記立体障害により、活性化された多糖が得られ、その架橋もしくは重合は、単にそれを立体的に障害しない条件の再導入により継続できる

ことが全く予期されずに見出されたのである。第二に、この方法によって得られた多糖ゲル組成物は、相当する架橋反応を単一工程において完全に架橋されたゲルまで実施した場合に得られたと考えられる、粘弾性ゲルではない強剛かつ濃密なゲル構造を形成しないことも全く予期されずに見出されたのである。しかも、上述のように本発明によって得られる新規なゲル構造は実質的に非可逆性のゲル構造を示し、水または他の

水性媒質と接触しても見るべき程度の膨潤を生じない。一般的にこれは、上記再膨潤が、本発明の方法で得られた容量に基づいて10%未満であることを意味する。

本発明は何らかの理論によって限定されるものではないが、本発明によって得られる新規な構造は、きわめて強剛な構造を与える著しく濃密なネットワークとは異なり、存在するポリマー鎖と存在する鎖の伸長の間の架橋の組合せにあるものと考えられる。このような機構は、粘弾性生成物が本発明によって得られるという事実から示唆される。

ここで用いられる「架橋反応の立体障害」の語は、広い意味で解釈されるべきものである。すなわち、必ずしも完全な障害と解すべきではなく、むしろ多くの場合、上述の反応の部分的な障害と解釈される。すなわち、重要な点は、新たな反応部位が関与して起こる最終的な架橋反応を可能にする架橋の割合が実質的に低下することである。

同様に、「非立体障害条件の再導入」の語もまた、広い意味で解釈されるべきものであり、一般的には、この非立体障害条件は必ずしも架橋反応を開始させる場合に用いられた条件と正確に同一の立体的条件を意味するものではない。すなわち一般的に重要なことは、上記非立体障害条件は、上述の立体障害条件の場合よりも迅速な反応が起こり得るということである。

架橋反応の立体障害は様々な方法で達成できるが、この点に関する本発明の好ましい実施態様は、架橋反応を実施する水性媒質を媒質中の多糖濃度が低下するように希釈することによって立体障害を起こす場合である。

非立体障害条件を再導入するためにも様々な方法が可能であるが、この点に関



、する好ましい実施態様は、架橋反応が実施される水性媒質を蒸発させることによって上記媒質中の多糖濃度の上昇を達成する場合である。こ

の点に関する他の好ましい実施態様には、架橋反応が実施される水性媒質を透析する方法がある。

本発明の好ましい実施態様においては、架橋反応の立体障害は、架橋剤が消費されてしまう前に行われる。これはまた、一般的に、上述の消費されていない架橋剤の存在下に非立体障害条件が再導入が開始されることを意味する。

架橋反応の立体障害は、本発明の方法で用いられる総ゲル化時間の50～90%の範囲で、組成物の意図された用途に適切な弾性または粘稠度も考慮して、開始されまたは実施される。

本発明の概念は当然、架橋が可能で水性媒質に可溶性の任意の生体適合性多糖に適用することができる。「水溶性」の語はしたがって広い意味で解釈されるべきであり、必ずしも純水である必要はない。すなわち水溶液とは水が主成分の任意の溶液を意味する。本発明の関連において好ましい多糖のサブグループはしかしながら、グルコースアミングルカンであり、ヒアルロン酸は中でもとくに興味のもたれる例である。

本発明に関連して使用される架橋剤は、生体適合性の前提条件が満足されることの保証を考慮して、多糖との関連で有用な任意の既知の架橋剤である。しかしながら好ましくは、架橋剤はアルデヒド、エポキシド、ポリアジリジル化合物、グリシジルエーテルおよびジビニルスルホンからなる群より選択される。これらの中でとくに好ましいグループはグリシジルエーテルであり、その中の好ましい例としては1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテルを挙げることができる。またこの関連で「多官能性」とは二官能性を包含することを付記しなければならない。

多官能性架橋剤の存在下における初期の架橋反応は、主としてエーテルまたはエステル反応のいずれを促進すべきかによって、様々なpH値で実

施することが可能である。好ましくは、これは上記架橋反応が、エーテル形成を

促進する場合には、アルカリ性 pH で、とくに約 9 を越える pH たとえば 9 ~ 12 の pH 範囲で実施されることを意味する。エステル形成を促進する場合には、上記架橋反応は酸性の pH とくに pH 2 ~ 6 で実施するのが好ましい。

本発明の興味ある一態様は、調製された架橋多糖ゲル組成物が、本発明で製造が可能になった粘弾性組成物をそのまま使用する場合である。このような粘弾性組成物は、たとえば、眼科手術において、代用関節滑液として、点眼液として等の有用性があり、上述のように、本発明は、このような用途に適合する粘弾性の調整を可能にする。すなわち、本発明の立体的技術を用いれば、多かれ少なかれランダムなカップリング部位での従来使用されてきた技術によるよりも制御された方法での鎖の延長、鎖の分岐、架橋等を得ることが可能である。

さらに本発明によって得られたゲルは、水性媒質の存在下にもそれらの元の容量を維持していないという事実から、新規な生成物はこれらのまたは他の医薬的使用に妨害となるあるいは否定的な容量上の効果を生じることがない。

本発明によれば、多糖ゲル組成物内に、多糖ゲル担体にとって望ましいかまたは許容し得る任意の生物活性物質を包含させることができる。この場合、本発明の方法に用いられる希釈-濃縮技術により、多糖を非立体障害条件に付す前に、上記生物活性物質の封入が可能である。すなわち、非立体障害条件は一般的には濃縮操作を意味するのであるから、このような操作は、生物活性物質が上記担体中に包含されたときよりもさらに凝縮された相に存在することを意味する。換言すれば、生物活性物質は、従来既知のゲル架橋反応に比較してはるかに長時間、保持されることが可能にな

る。これにより、活性物質のより優れた徐放性プロフィールを得ることができる。

組成物中への生物活性物質の導入に関しては、医薬的用途にそのまま使用する製剤を得るために、生理的 pH および塩濃度条件への条件の調整を行うことが好ましい。このような生理的な調整は、本発明の方法の第二工程がこのような条件下に良好に進行することが見出されたように、反応条件としても好ましい。

本発明は、生物活性物質に関し従来の場合における上記物質の使用に比較して

何らかの点で限定されるものではない。換言すれば、処置すべき状態が選択されるべき特定の物質を決定するものである。

しかしながら、本発明に関連して興味のある物質はホルモン、サイトカイン、ワクチン、細胞、および組織増殖性物質からなる群より選択することができる。すなわち、これらの物質に関連して、本発明の新規なゲル組成物の性質の独特の組合せ、すなわち、主として著しいデポまたは徐放性および非膨潤性は、きわめて有利である。

生物活性物質の一つの興味あるグループは、したがって、多糖ゲルがその担体として有利な組織増殖性物質である。このような生成物に関するさらに詳細は、W0 94/21299号に見いだすことができる。さらに詳しくは、好ましい組織増殖性物質は、コラーゲン、デンプン、デキストラノーマー、ポリラクチドおよびそれらのコポリマー、ならびにポリ-β-ヒドロキシブチレートおよびそれらのコポリマーから選択されるポリマーである。

ホルモンに関してはエリトロポエチンおよびカルシトニンがとくに好ましい。

本発明の方法はまた、生物活性物質を、それが多糖ゲル構造またはその架橋剤と反応する官能基を含有することを条件に、多糖ゲル構造またはそ

の架橋剤との化学反応によって導入することもできる。これにより、たとえば活性成分の放出速度が、この場合ゲルネットワークからの上述の物質の解離または移動速度によらずポリマーネットワークの崩壊または分解によって決定されるという独特の性質または性質の組合せが得られる。

本発明による最後に挙げた技術の修飾は、活性成分の官能基を予め多糖の架橋剤と反応させておいてもよいことを意味する。多糖の架橋に使用したのと同じ架橋剤を用いることが好ましい。

本発明の方法は、新規な多糖ゲル組成物または構造を提供するので、本発明の他の態様は調製された新規な多糖ゲル組成物によって表される。この点に関する保護の範囲には、上記方法によって調製されたすべての多糖ゲル組成物のみでなく、類似の技術によって得られる任意の多糖ゲル組成物も包含される。

他の方法で表現すると、本発明はまた、架橋可能な多糖をその多官能性の架橋

剤により 2 工程で架橋し、この場合、最初の架橋工程はゲル化が起こる前に架橋反応の立体障害によって終結させ、第二の架橋工程は上記架橋反応に対して非立体障害条件を再導入することによって開始させ、この架橋反応を粘弾性ゲルに到達するまで継続することによって得られる架橋生体適合性多糖ゲル組成物を提供するものである。

本発明の方法に関連して好ましいまたは興味がある特徴として提示された特徴はすべて、上記多糖ゲル組成物自体にも適用されるものであり、ここにもう一度繰り返す必要はないと考える。

本発明のさらに他の態様は、非立体障害条件での架橋反応の最終工程を、以後の段階または部位に、たとえば組成物の最終的使用時に延期することにより中間体生成物を取得する場合によって表される。すなわち、架橋反応の立体障害後に得られる中間体生成物は、架橋反応の終結をずっと後の

段階で実施することが可能な安定性を有することが見出されたのである。

本発明はまた、治療用または予防用組成物として使用するための上に定義した組成物に関する。

本発明の他の特徴は、哺乳動物とくにヒトが好ましい適用例である上述した特定の治療もしくは予防の目的、組織の増殖およびホルモン処置用の治療または予防用組成物の製造のための上記組成物の使用である。

最後に、本発明は、哺乳動物とくにヒトの治療的および予防的処置方法においてこのような処置を必要とする哺乳動物に上に定義された組成物を投与することからなる方法に関する。

#### 実施例

次に、本発明を以下の非限定的実施例によって例示する。

##### 実施例 1

##### ポリマーの活性化

##### a. アルカリ性条件下

連鎖球菌の発酵により製造されたヒアルロン酸 10 g の形態での多糖を pH > 9 の 1 % NaOH 100 ml 中に溶解した。1, 4-ブタンジオールジグリシジルエーテル

の形態の架橋剤を 0.2% の濃度に添加した。この溶液を 40℃ で 4 時間インキュベートした。

#### b. 酸性条件下

実験は、1 a の NaOH に代えて溶液に 1% の酢酸を添加することにより pH 約 2 ~ 6 の酸性で行う以外は 1 a と同様に実施した。

#### 実施例 2

##### 粘弾性ゲルの調製

1 a および 1 b によるインキュベーション溶液を、最終的に所望の濃度の 2 倍容または約 0.5 ~ 1% に希釈し、中和した。このゲルをついでロ

ータリーエバポレーターで蒸発させて粘弾性ゲルとした。

#### 実施例 3

##### デキストラノーマー粒子を含有するゲルの調製

1 a および 1 b のインキュベーション溶液を濃度 1% に希釈し、この溶液に、20 g の乾燥デキストラノーマー粒子 [Sephadex<sup>®</sup> 25, Pharmacia] を混合した。粒子は、デキストラノーマービーズによる水の吸着によって達成されるヒアルロン酸の濃縮の結果として数分で、ヒアルロン酸ポリマーの架橋により封入された。

得られた粘弾性は安定で、オートクレーブ処理が可能であり、細い皮下注射用の注射針によって注射することができる。

#### 実施例 4

##### エリトロポエチン (EPO) 含有デポ製剤として使用するためのゲルの調製

実施例 1 a で得られたインキュベーション溶液を濃度 1% に希釈し、製造業者 (Ortho Biotech Inc., Raritan, USA) の説明書に従いクエン酸緩衝液を添加して水溶液中で良好な安定性を示す pH に調整した。攪拌下に EPO  $5 \times 10^4$  IU を加えた。この溶液を 1/4 容に蒸発させると、ポリマーが架橋されてデポ製剤を生じ、20,000 IU/ml 量の EPO が回収された。

#### 実施例 5

##### カルシトニン含有デポ製剤として使用するためのゲルの調製

サケからのカルシトニン 100 IU/ml [Miacalcic<sup>(®)</sup> Sandoz] を実施例 1 b によって製造された 2 % ポリマー溶液と混合し、この溶液をロータリーエバポレーターで 5 % (250 IU/ml) に濃縮した。右前肢に慢性的な跛行を有するウマを 2 週間、毎週 2 ml s.c. の注射によって処置した。その後 6 週で上述のウマは痛みが消失した。血清カルシウムはわずか 12 % に低下した。

#### 実施例 6

持続的に放出されるヘパリンを含有するゲルの調製

実施例 4 の希釈活性化ポリマー中に、ヘパリンを、ポリマーの 5 % 量溶解させた。得られた混合物を 1 時間平衡化し、ついで 1/4 の容量に蒸発させた。その凝固阻害性の放出は生理食塩水中における 16 日間のインキュベーション中、認められた。

#### 実施例 7

立体的に制御された位置にヘパリンが共有結合したゲルの調製

実施例 1 の活性化ポリマーを激しく撹拌しながらメタノール中で沈殿させた。得られた微細な糸状の沈殿を一夜乾燥した。ヘパリンは実施例 1 によって活性化した。上記インキュベーション後に (40℃, 4 時間) ポリマー沈殿を活性化ヘパリン溶液と混合した。この混合物を一夜インキュベートし、翌日にゲル溶液を中和し、粒状化し、残留する反応原料を洗浄した。

形成されたゲルは増殖因子、とくに塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を結合できたが、全血の凝固の阻害は全く示さなかった。

#### 実施例 8

キトサンの陽性に荷電した基を含むゲルの調製

7.5 g のヒアルロン酸ポリマーおよび 2.5 g のキトサン [Cure<sup>(®)</sup>, Protal<sup>(®)</sup> 参照] の混合物のインキュベーションを、実施例 1 に従って実施した。解離および中和後に、共重合した粘弾性溶液が得られた。この溶液は治癒の遅い疼痛性患部に適用すると治癒促進性を有する。

#### 実施例 9

立体的にカップリングさせたゲルの調製

7. 5 g のヒアルロン酸を実施例 1 a に従って活性化した。同様にして

デキストラン 2. 5 g を活性化した。ヒアルロン酸をメタノール中で沈殿させ、この沈殿をついで希釈した活性化 0. 5 % デキストラン溶液 500 ml と混合した。攪拌し、pH および塩濃度を調整すると、粘弾性溶液が得られた。この溶液 5 ml を触痛と「クリーキング」の形の炎症を繰り返し示したアキレス腱鞘に注入した。4 週後にアキレス腱の問題は消失した。

#### 実施例 10

GMCSF を含有する治療用デポ剤として使用するためのゲル調製

生成物は実施例 5 に従って調製されたが、カルシトニンに代えて顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、GMCSF (Leucomax<sup>(®)</sup>) 1 mg / g ポリマーを添加した。

#### 実施例 11

インフルエンザ A 2 型死滅ウイルス含有ゲルの調製

EPO に代え、希釈活性 1 % ポリマー溶液 100 ml 当り、40 960 HAU の死滅インフルエンザウマウイルスを加えた以外は、実施例 4 と同様にして調製を実施した。4 × に濃縮後、製剤は 1600 HAU / ml を含有した。流行性インフルエンザに関連ある 100 頭以上のウマにワクチン接種を行い、この製剤は感染の防御にきわめて有効であり、この防御は長期に (6 ヶ月以上) 維持されることが見出された。

#### 実施例 12

生存細胞懸濁液を含有する新鮮なゲルの調製

5 ml の線維芽細胞培養体を実施例 1 a による中和溶液 100 ml と混合した。この混合物に酸素を飽和させ、半容量に乾燥した。生存細胞を含有する粘弾性溶液が得られた。

#### 実施例 13

短鎖小ペプチドを含有する濃密な微粒子化ゲルの調製

実施例 1 a による活性化中和ゲルに、12 アミノ酸を有するペプチド 5 mg を添加した。このゲルを攪拌しながら 10 % に蒸発させ、鉱油に懸濁した。メタノール

を添加後、乾燥ゲル粒子をろ過し、残留する鉱油から完全に洗浄した。

#### 実施例 14

実施例 13 による短鎖小ペプチドを含む濃密微粒子化ゲルを含有するゲルの調製

実施例 1 a により活性化された中和ポリマーの 1 % 溶液に実施例 13 からの微小球を加えた。ゲルをついでその容量の半分に蒸発させた。微細に分散した微小球を含有する均一な注射可能な安定なゲルが形成された。

#### 実施例 15

サイズ 40 ~ 120  $\mu\text{m}$  の球状ポリメチルメタクリレート (PMMA) ビーズ含有ゲルの調製

実施例 1 a に従って 1 % に希釈し、中和活性化されたポリマー 5 g に 100mg のポリメチルメタクリレート (PMMA) の球体を添加した。3 % のポリマーゲルに蒸発させると安定な注射可能な粘弾性ゲルが得られた。

#### 実施例 16

疎水性抗原が添加された 500nm PMMA フラグメント含有ゲルの調製

実施例 11 に従って A2 ウイルスから調製されたヘマグルチニン抗原を 500nm PMMA 粒子上に疎水性相互作用によって吸着させた。上記粒子を、実施例 15 による 1 % 溶液に加え、容量を半分に低下させた。安定な均一の粘弾性ゲルが形成し、これは高いアジュバント効果を有するワクチンとして有用であった。

#### 実施例 17

常法によって調製されたゲルおよび本発明に従って調製されたゲルの間の

水が自由に利用できる条件下での再膨潤の程度の比較

Laurent ら、1964 年らびに上述の実施例 1 および 2 に従って調製されたヒアルロン酸ゲルをそれらの膨潤容量の半分に乾燥した。ついでそれらをそれらの元の溶液の中に再導入した。既知のゲルはそれらの元の容量に膨潤したが、本発明の実施例 1 および 2 によるゲル組成物はわずかな限界の (10 %) 膨潤を示したにすぎなかった。

#### 実施例 18

ヒアルロン酸によりゲルに共重合化された EPO および EPO が上記ゲルの濃縮によっ



て封入された実施例 1 によるゲルの生物活性の比較

慢性的な尿毒症により生じる貧血をEprex<sup>(1)</sup> (CILAG) で処置されている 4 例の患者を 2 ヶ月、それぞれの月について以下の投与計画に従った用量で処置した：

患者No.	1	2	3	4
用量IU	60,000	70,000	70,000	50,000
1 ヶ月	直接ゲル化デポ剤	直接ゲル化デポ剤	対照	対照
2 ヶ月	対照	対照	濃縮	濃縮

直接ゲル化デポ剤：EP0の存在下に実施例 11 に従い緩やかな条件下にエポキシド架橋。

対照：US 4,141,973号に従い調製された鶏冠からの分子量約  $6 \times 10^4$  の 4% ヒアルロン酸 (Healon<sup>(1)</sup> Pharmacia) 中に溶解したEP0。

濃縮：濃縮によってゲル化した活性化ゲル内に封入されたEP0。

用量はヘモグロビンレベルを維持するために患者に通常要求された 1 月あたりの総用量として選択した。EP0の血清レベルは免疫化学的方法によって定期的に分析した。

#### 結 果

デポ製剤の機能性効果を表現する一般的方法是曲線面積 (EP0単位×日)

を計算する方法である。この試験では血中のヘモグロビンレベルの形でのバイオアベイラビリティも、0 = 維持、+ = 増加および - = 減少として与える。

#### 表

患者No./月	1/1	1/2	2/1	2/2	3/1	3/2	4/1	4/2
曲線下面積	41	424	57	534	224	952	567	656
ヘモグロビン制御	-	+	-	+	0	+	+	+

#### 結 論

濃縮したデポ剤中へのEP0の封入は分析期間中最高の可能な放出を示した。EP0の存在下にゲル化反応を実施する試みはこのホルモンを分解し、きわめて低い放出しか記録できなかった。

[ 國際調查報告 ]

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 96/00684

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: C08B 37/08, C08L 5/08, A61K 31/725

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: C08B, C08L, A61K, A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0203049 A1 (LKB-PRODUKTER AB), 26 November 1986 (26.11.86), abstract, page 5, line 5 - line 13 --	1
A	US 5128326 A (ENDRE A. BALAZS ET AL), 7 July 1992 (07.07.92), column 2, line 35 - line 49, column 3, line 47 - line 52, column 6, line 22 - line 31 --	1-4,9,12,15, 19,28
A	US 4863907 A (KATUKIYO SAKURAI ET AL), 5 Sept 1989 (05.09.89), column 2, line 31 - line 35, column 3, line 50 - line 66, abstract, claims -----	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 October 1996

Date of mailing of the international search report

24 -10- 1996

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office

Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Agneta Österman Wallin

Telephone No. +46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 96/00684

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 30  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods (see PCT Rule 39(iv))
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Information on patent family members

05/09/96

 International application No.  
 PCT/SE 96/00684

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A1- 0203049	26/11/86	JP-A- 62025102	03/02/87
		SE-B, C- 458525	10/04/89
		SE-A- 8502574	24/11/86
		US-A- 4973683	27/11/90
US-A- 5128326	07/07/92	AU-B- 569157	21/01/88
		AU-B- 572419	05/05/88
		AU-A- 4304585	12/06/86
		AU-A- 7217387	27/08/87
		CA-A- 1230186	08/12/87
		DE-A, C- 3520008	19/06/86
		DE-A, C- 3546811	31/10/90
		FR-A, B- 2574414	13/06/86
		GB-A, B- 2168067	11/06/86
		GB-A, B- 2181147	15/04/87
		GB-A, B- 2181148	15/04/87
		GB-A, B- 2205848	21/12/88
		JP-C- 1745462	25/03/93
		JP-A- 2138346	28/05/90
		JP-B- 4030961	25/05/92
		JP-B- 6037575	18/05/94
		JP-A- 61138601	26/06/86
		SE-B, C- 460792	20/11/89
		SE-C- 501828	22/05/95
		SE-A- 8503486	07/06/86
		SE-A- 8901672	10/05/89
		US-A- 4582865	15/04/86
		US-A- 4605691	12/08/86
		US-A- 4636524	13/01/87
		AU-B- 595524	05/04/90
		AU-A- 6090386	04/06/87
		DE-A- 3684887	21/05/92
		EP-A, B- 0224987	10/06/87
		SE-T3- 0224987	
		JP-B- 6092320	16/11/94
		JP-A- 62129226	11/06/87

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Information on patent family members

05/09/96

International application No.

PCT/SE 96/00684

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4863907	05/09/89	DE-A- 3583963	10/10/91
		EP-A,B- 0161887	21/11/85
		SE-T3- 0161887	
		EP-A,B- 0167363	08/01/86
		SE-T3- 0167363	
		JP-A- 61164558	25/07/86
		US-A- 4716224	29/12/87
		JP-B- 6034814	11/05/94
		JP-A- 61168362	30/07/86
		JP-B- 6011694	16/02/94
		JP-A- 61172808	04/08/86
		JP-B- 6049723	29/06/94
		JP-A- 61012701	21/01/86

---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, CZ, DE, DE, DK, DK, EE, EE, ES, FI, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN